

泛素羧基末端水解酶 1 基因缺失对 雌性小鼠生殖系统发育的影响

吴 比, 梁珊珊, 阮井玲, 黄 鑫, 滕晓明, 洪 岭
(同济大学附属第一妇婴保健院辅助生殖科, 上海 200001)

[摘要] 目的 研究泛素羧基末端水解酶 L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase L1, UCH-L1) 基因缺失对雌性小鼠生殖系统的影响。方法 利用阴道涂片、免疫组织化学、蛋白质印迹和 RNA 干扰等方法, 分析 UCH-L1 基因缺失对小鼠卵巢功能及卵泡发育的影响。结果 UCH-L1 基因缺失纯合子成年雌性小鼠的体质量降低, 运动困难, 且子宫偏细。在 UCH-L1 基因缺失纯合子小鼠的卵巢和子宫中检测不到 UCH-L1 蛋白表达, 卵巢体积明显小于杂合子小鼠, 其卵巢皮质层存在一些原始卵泡或闭锁卵泡, 没有成熟卵泡和黄体。雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、卵泡刺激素受体 (follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)、黄体生成素受体 (luteinizing hormone receptor, LHR) 及孕酮受体 (progesterone receptor, PR) 等生殖关键受体在 UCH-L1 缺失纯合子小鼠和杂合子小鼠卵巢中都有表达, 其中纯合子小鼠卵巢中 ER 的表达水平明显低于杂合子小鼠。通过 RNA 干扰的方法下调生发泡 (germinal vesicle, GV) 期卵母细胞中 UCH-L1 的表达, 能明显降低卵母细胞的成熟率。结论 UCH-L1 基因缺失雌性小鼠不具备形成成熟卵泡及排卵的能力, 卵巢中 ER 表达量显著降低。推测 UCH-L1 有可能通过下调卵巢中 ER 的表达, 影响卵母细胞成熟及排卵过程。

[关键词] 卵巢; 卵母细胞成熟; 泛素羧基末端水解酶 1; 小鼠

[中图分类号] Q492.5; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)04-0296-10

泛素羧基末端水解酶 (ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH) 是去泛素化家族中的重要成员^[1], 其主要功能是将泛素羧基端连接小肽或酯类分子水解下来。UCH-L1 具有去泛素化作用、泛素连接酶活性和稳定细胞内泛素单体的功能, 参与泛素介导的蛋白质降解途径, 在神经系统^[2-3]、生殖系统^[4-5]、肿瘤发生和转移^[6], 以及肿瘤细胞

增殖^[7]过程中发挥重要作用。

已有研究证实, UCH-L1 参与卵子发生^[5]。在鱼类的卵巢组织中, UCH-L1 主要表达于卵巢的卵黄上; 在发育和滞育的卵黄中 UCH-L1 表达水平较高, 而在成熟细胞的卵黄中几乎检测不到 UCH-L1, 由此推测 UCH-L1 与卵黄的发生存在密切关系^[8]。UCH-L1 在哺乳动物卵母细胞中高表达^[5, 9], 与卵母细胞皮质和减数分裂纺锤体相关联^[10]。抑制 UCH-L1 的作用后, 猪卵母细胞停滞在第 1 次减数分裂中 - 后期过渡点^[11]。在卵母细胞成熟过程中, 向小鼠的生发泡 (germinal vesicle, GV) 期卵母细胞中注入 UCH 家族酶活性抑制剂泛素 - 醛 (ubiquitin aldehyde, UBAL) 后, 引起纺锤体和第一极体发育异常, 导致其减数分裂停滞在减数分裂 I (meiosis I, MI) 期,

[收稿日期] 2020-03-30

[基金项目] 同济大学国家自然科学基金项目校内培育项目 (22120180406)

[作者简介] 吴 比(1986—), 女, 博士, 主管技师, 研究方向: 生殖内分泌及辅助生殖。

E-mail: biowubi@163.com

[通信作者] 洪 岭(1979—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 辅助生殖。E-mail: Hongling789@163.com

提示UCH-L1通过调节皮质和减数分裂期纺锤体来影响卵母细胞的成熟^[12]。

本研究拟利用现有的 *UCH-L1* 基因缺失小鼠模型, 观察其卵巢功能和卵泡发育等生殖相关表型, 以期建立一种新的生殖功能障碍小鼠模型, 并为研究UCH-L1分子途径在卵泡发育中的作用机制提供必要工具。

1 材料与方法

1.1 *UCH-L1* 基因缺失小鼠的繁殖、饲养

SPF级8周龄的 *UCH-L1* 基因缺失杂合子 (*UCH-L1*^{+/-}) 小鼠 (3♂:2♀) 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所刘晓华实验室赠送[品系名为B6;129P2-*UCH-L1*tm1Dgen/Mmnc, 来自美国突变小鼠区域性资源中心 (Mutant Mouse Regional Resource Centers, MMRRC)]。SPF级8周龄野生型 (*UCH-L1*^{+/+}) C57BL/6J 雌性小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)-2018-0006]。所有小鼠都饲养于同济大学实验动物房[SYXK(沪)-2020-0002]层流架中, 分笼饲养, 喂食转基因动物专用鼠粮[江苏省协同医药生物工程有限公司, 苏饲证(2019)01008], 自由饮水, 室温22~25℃, 相对湿度为(50±10)%, 每天14h光照, 适应性饲养1周。为了保种和获得 *UCH-L1* 基因缺失纯合子 (*UCH-L1*^{-/-}) 小鼠, 安排3个合笼: (1) 1♂ *UCH-L1*^{+/-}与2♀ *UCH-L1*^{+/-}合笼; (2) 1♂ *UCH-L1*^{+/-}与2♀ *UCH-L1*^{+/+} (野生型) 合笼; (3) 1♂ *UCH-L1*^{+/-}与2♀ *UCH-L1*^{+/+}合笼。

1.2 *UCH-L1* 基因缺失子代小鼠的基因型鉴定

幼鼠出生3周后与母鼠分离, 取约0.5cm尾尖组织, 提取小鼠基因组DNA, 采用PCR法鉴定 *UCH-L1* 基因缺失。PCR引物1序列为5'-CCTTGCCCTCCGTCCTCTATTAAAGC-3', 引物2序列为5'-GGGTGGGATTAGATAAATGCC-TGCTCT-3', 引物3序列为5'-CTCTCCCCAG-ACTTAAGCTGCTTTG-3'。PCR反应的退火温度为58℃。目的基因片段大小分别为447bp和213bp。其中, 仅出现1个大小为213bp的条

带(引物1和3扩增获得)时判定为野生型 (*UCH-L1*^{+/+}), 仅出现1条大小为447bp的条带(引物2和3扩增获得)时判定为纯合型 (*UCH-L1*^{-/-}), 出现2条大小分别为447bp和213bp的条带时判定为杂合型 (*UCH-L1*^{+/-})。

1.3 *UCH-L1* 基因缺失雌性小鼠繁殖性能的检测

将得到的杂合型 (*UCH-L1*^{+/-}) 和纯合型 (*UCH-L1*^{-/-}) 雌性小鼠饲养到12周, 通过阴道涂片和吉姆萨染色的方法检测其发情周期; 之后与性成熟的野生型 (*UCH-L1*^{+/+}) 雄性小鼠按照1:2的比例合笼, 测定其繁殖性能。

1.4 苏木精-伊红染色观察卵巢及卵泡形态

取12周龄的野生型 (*UCH-L1*^{+/+})、杂合型 (*UCH-L1*^{+/-}) 和纯合型 (*UCH-L1*^{-/-}) 雌性小鼠各2只, 麻醉过量致死收集卵巢组织, 进行固定、包埋和切片。取卵巢最大纵切面的蜡片, 脱蜡后进行苏木精和伊红染色, 最后脱水封固。光学显微镜下观察卵巢中卵泡的大小、形态和分类。

1.5 免疫组织化学法检测卵巢组织中关键激素受体的表达

将1.4节中获得的卵巢组织切片, 采用免疫组织化学法检测雌激素受体β (estrogen receptor-β, ER-β)、卵泡刺激素受体 (follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)、黄体生成素受体 (luteinizing hormone receptor, LHR) 及孕酮受体A (progesterone receptor-A, PR-A) 和 *UCH-L1* 的蛋白表达情况, 其中一抗包括兔抗FSHR和LHR多克隆抗体(稀释比例均为1:50)购自武汉博士德生物工程有限公司, 鼠抗ER-β单克隆抗体(1:150)和兔抗PR-A单克隆抗体(1:100)购自英国Abcam公司, 兔抗UCHL1多克隆抗体(1:200)购自美国Invitrogen或Thermo Fisher Scientific公司。卵巢组织切片经抗原修复、山羊血清封闭后, 加入一抗, 4℃反应过夜; PBS洗3次, 加入生物素化二抗, 37℃孵育45min; PBS洗3次, 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素-生物素复合物三抗, 37℃孵育45min; PBS洗3次, 用DAB显色试剂盒显色, 苏木精对比染色, 脱水和封固。光学显微镜下观察并拍照。

1.6 蛋白质印迹法检测卵巢组织中关键蛋白含量

利用美国 Thermo Fisher Scientific 公司的 T-PER 组织蛋白提取试剂提取小鼠卵巢和子宫组织中总蛋白, 测定蛋白质浓度。取 200 μL 组织蛋白样品, 每孔上样 15 μL , 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (9% 分离胶, 5% 浓缩胶) 电泳: 80 V 恒压 15~20 min, 140 V 恒压至指示剂到达凝胶下端。

电泳结束后, 将分离蛋白条带电转移至聚偏二氟乙烯膜上: 200 mA 恒定电流 3 h。然后用 6% 脱脂奶粉封闭液 (4% 预冷) 封闭后, 加入一抗 (抗 UCH-L1、FSHR、LHR、ER- β 和 PR-A 抗体同 1.5 节, 稀释比例分别为 1:1 000、1:400、1:250、1:1 000 和 1:1 000; 兔抗 GAPDH 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 稀释比例为 1:2 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 6 次 $\times$ 10 min 后, 加入碱性磷酸酶标记的山羊抗兔二抗 (1:4 000), 室温摇床上反应 1 h。TBST 缓冲液洗膜 6 次后, 采用电化学发光法显色, 放入成像系统中拍照。

1.7 RNA 干扰 UCH-L1 表达后检测卵母细胞成熟情况

将 12 周龄的 C57BL/6J 雌性小鼠分笼饲养, 于 9:00 左右注射孕马血清 (购自宁波第二激素厂) 7.5 U/只。48 h 后麻醉致死小鼠, 取出卵巢组织, 用注射器刺破卵泡, 释放出卵丘卵母细胞复合体。用透明质酸酶 (美国 Sigma 公司产品) 进行消化, 去除颗粒细胞, 收集 GV 期卵母细胞。根据 GenBank 中 UCH-L1 基因序列, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成 UCH-L1 siRNA 序列 (5'-GGAAGTTAGCCCTAAAGT-3'), 同时合成一段无意义序列作为阴性对照。将这 2 种序列分别注射入 GV 期卵母细胞, 即实验分为 siRNA 干扰组和阴性对照组, 每组各 5 只, 重复 3 次。注射用固定针的外径为 120 μm , 内径为 20 μm ; 注射针孔径为 20 μm 。注射 RNA 质量浓度为 100 ng/ μL 。

将注射后的卵母细胞接种于事先配制好的特定培养液 (TCM199 基础培养液中添加 10% 胎牛血清、0.05 U/mL FSH、0.05 U/mL LH、1 $\mu\text{g/mL}$ 17 β 雌二醇、24.2 mg/L 丙酮酸钠、10 ng/mL

EGF、100 U/mL 青霉素和 10 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素) 中培养 24 h, 观察并统计 GV 期卵母细胞成熟为 MI 期卵母细胞的情况。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UCH-L1 基因缺失杂合子小鼠的子代基因型

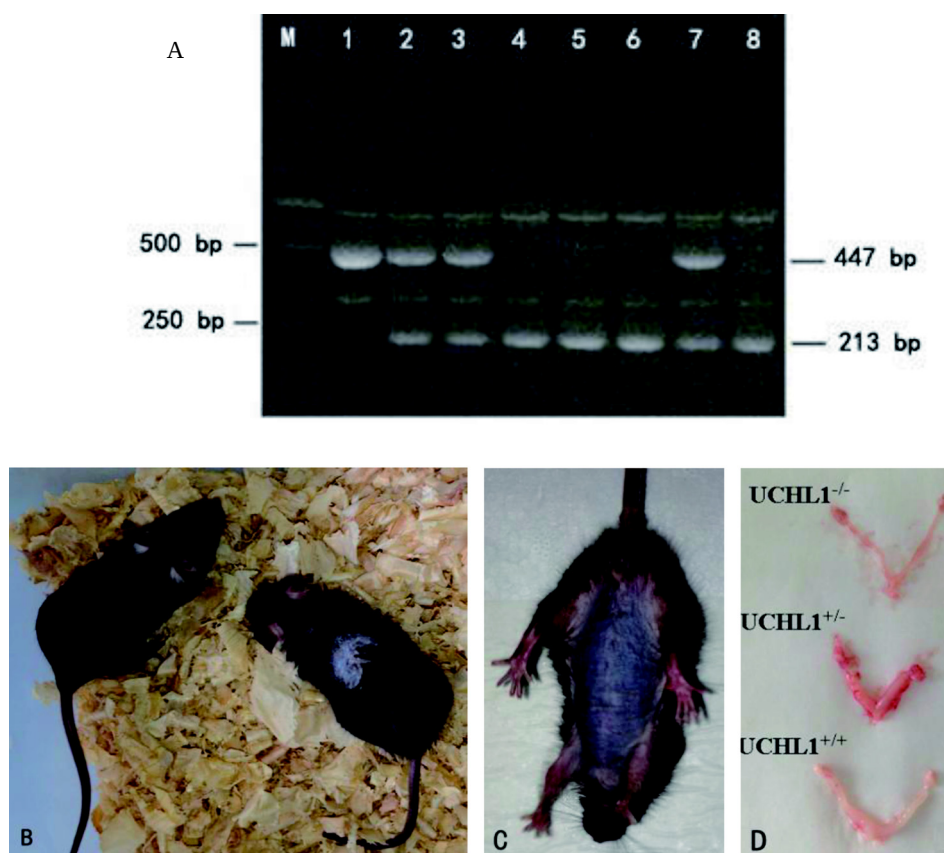
UCH-L1^{+/-}小鼠自交获得 8 只仔鼠 (编号为 1#~8#), 提取 DNA 并鉴定小鼠基因型。PCR 结果显示: 4#、5#、6# 和 8# 小鼠在 213 bp 处有 1 个 PCR 条带, 提示为 UCH-L1^{+/+} (野生型); 1# 小鼠在 447 bp 处有 1 个 PCR 条带, 提示为 UCH-L1^{-/-} (纯合型); 2#、3# 和 7# 小鼠在 213 bp 和 447 bp 处各有 1 个 PCR 条带, 提示为 UCH-L1^{+/-} (杂合型) (图 1A)。

2.2 UCH-L1^{-/-}纯合型雌性小鼠的体表与子宫形态

由于属常染色体显性遗传, UCH-L1^{+/-}小鼠没有出现异常表型, 而 UCH-L1^{-/-}小鼠在出生时与 UCH-L1^{+/+}和 UCH-L1^{+/-}小鼠也无明显区别; 9 周龄时, UCH-L1^{-/-}小鼠体质量偏低, 毛发粗糙, 掉毛现象严重 (图 1B), 而且运动困难, 静止时不自主颤抖, 但其性腺外观看似正常 (图 1C)。取 9 周龄的 3 种基因型小鼠各 1 只, 经阴道涂片确定其处在发情间期 (需要说明的是, 纯合型小鼠没有发情周期, 不能确定其所处的发情时期), 将小鼠麻醉致死, 取子宫组织进行观察; 肉眼可见杂合型和野生型小鼠子宫没有明显区别且体积正常, 而纯合型小鼠子宫明显偏细 (图 1D)。

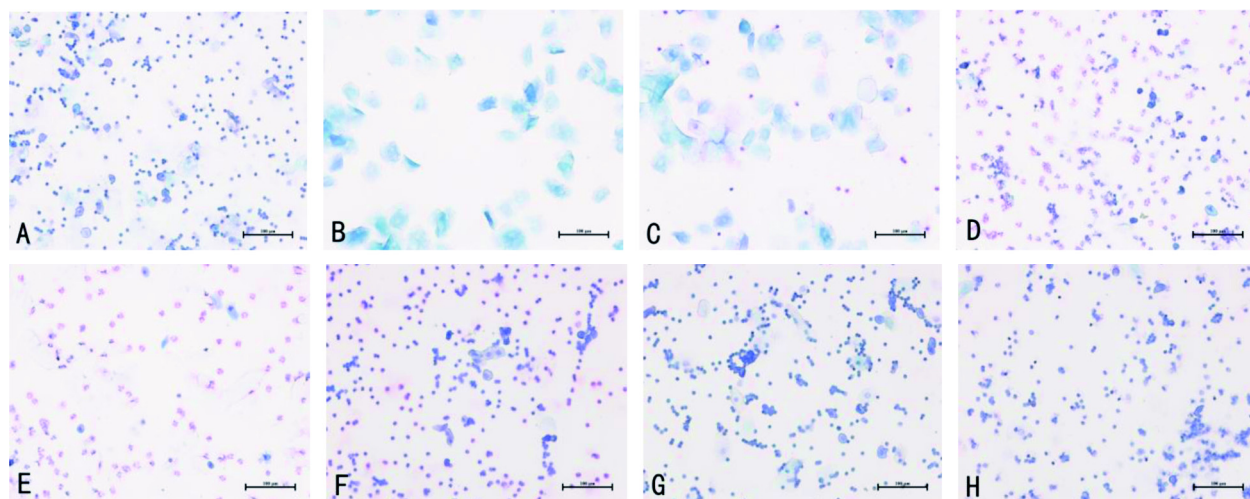
2.3 UCH-L1 基因缺失雌性小鼠的繁殖能力

阴道涂片显示, UCH-L1^{+/-}杂合型母鼠的发情周期正常, 阴道脱落细胞呈周期性的变化, 能够清晰地分辨出发情前期、发情期、发情后期和间情期 (图 2A~D); 而 UCH-L1^{-/-}纯合型母鼠的阴道涂片显示大量持续性的白细胞和少量皱缩的上皮细胞 (图 2E~H), 无周期性变化。



A 图示 $UCH-L1^{+/-}$ 小鼠自交子代 8 只小鼠的基因型检测结果 (M 为 DNA marker), B 图示 $UCH-L1^{+/-}$ (左) 和 $UCH-L1^{-/-}$ (右) 雌性小鼠的外形; C 图示成年 $UCH-L1^{-/-}$ 小鼠的皮肤和性腺外形; D 图示 3 种 $UCH-L1$ 基因型成年雌性小鼠的子宫外形。

图 1 $UCH-L1^{+/-}$ 小鼠自交子代小鼠的基因型检测以及 $UCH-L1$ 基因缺失雌性小鼠的体表与子宫形态观察
Figure 1 PCR detection of offspring mouse genotypes after the inbreeding of $UCH-L1^{+/-}$ mice, and the observation of body surface and uterus morphology in female mice with $UCH-L1$ gene deletion



A~D 为 $UCH-L1^{+/-}$ 杂合型小鼠, E~H 为 $UCH-L1^{-/-}$ 纯合型小鼠。标尺大小均为 100 μm 。

图 2 小鼠阴道涂片检测发情周期

Figure 2 Vaginal smear test for estrous cycle of $UCH-L1^{+/-}$ and $UCH-L1^{-/-}$ mice

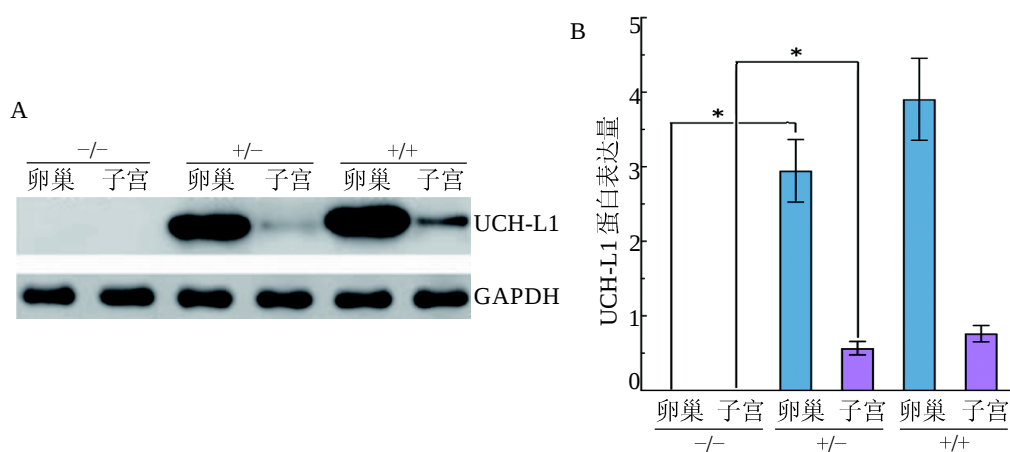
繁育试验显示, UCH-L1^{+/-}杂合型 4 只母鼠全部产仔, 产仔数为 37 只, 平均每窝产仔数为 9.25; 而 UCH-L1^{-/-}纯合型的 4 只母鼠无一产仔。

2.4 UCH-L1 基因缺失效果在雌性小鼠生殖系统中的验证

对 3 个基因型 (UCH-L1^{-/-}、UCH-L1^{+/-}和 UCH-L1^{+/+}) 的雌鼠采用蛋白质印迹法检测 UCH-L1 蛋白表达, 结果显示: UCH-L1^{-/-}雌鼠卵巢和子宫中完全没有表达 UCH-L1; 而 UCH-L1^{+/-}和 UCH-L1^{+/+}雌鼠卵巢中 UCH-L1 高表达, 子宫

中有少量表达; 其中 UCH-L1^{+/+}雌性小鼠子宫中的 UCH-L1 表达水平高于 UCH-L1^{+/-}小鼠 (图 3)。

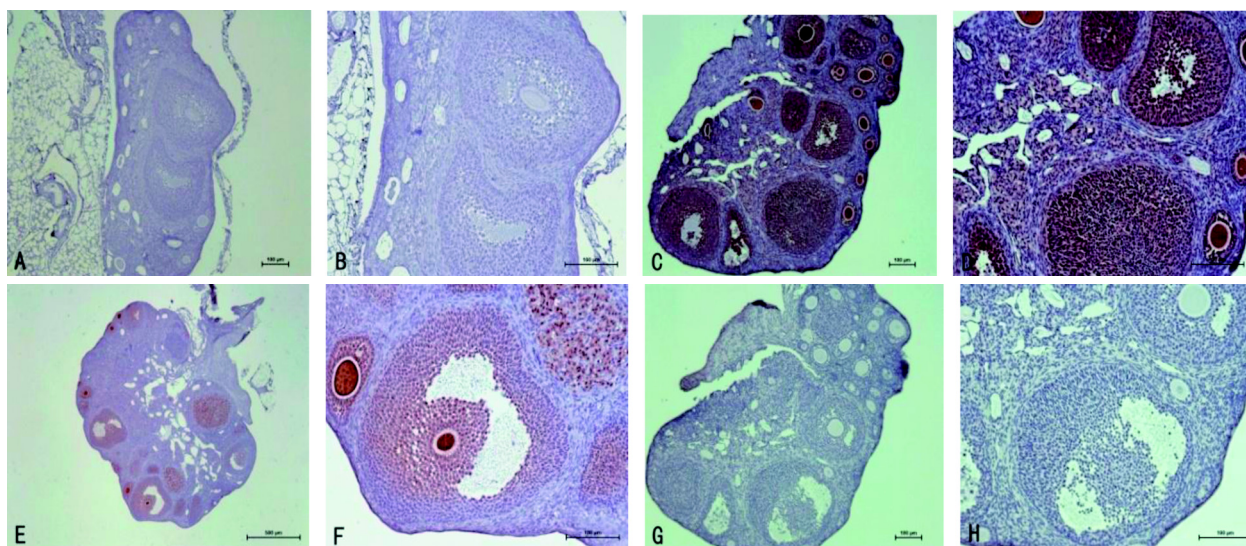
免疫组织化学检测结果 (图 4) 显示: UCH-L1^{-/-}小鼠卵巢组织中未检测到 UCH-L1 蛋白的阳性信号 (图 4A 和 B); 在 UCH-L1^{+/-} (图 4C 和 D) 和 UCH-L1^{+/+} (图 4E 和 F) 小鼠卵巢组织中都检测出较强的 UCH-L1 蛋白阳性信号, 而且卵母细胞中 UCH-L1 信号更明显, 在颗粒细胞和黄体中也有较高强度的 UCH-L1 蛋白信号。



注: * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 3 蛋白质印迹法检测各基因型雌性小鼠卵巢和子宫中 UCH-L1 蛋白表达

Figure 3 Western blotting detection of UCH-L1 protein in ovary and uterus of three genotypes of female mice



A 和 B 为 UCH-L1^{-/-}雌鼠, C 和 D 为 UCH-L1^{+/-}雌鼠, E 和 F 为 UCH-L1^{+/+}雌鼠, G 和 H 为阴性对照。B、D、F 和 H 分别是 A、C、E 和 G 的局部放大, 标尺大小均为 100 μm (E 的标尺大小是 500 μm)。

图 4 免疫组织化学检测各基因型雌性小鼠卵巢组织中 UCH-L1 蛋白表达

Figure 4 Immunohistochemical detection of UCH-L1 protein in ovary tissues of three genotypes of female mice

2.5 成年 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢中生殖关键激素受体的表达及分布

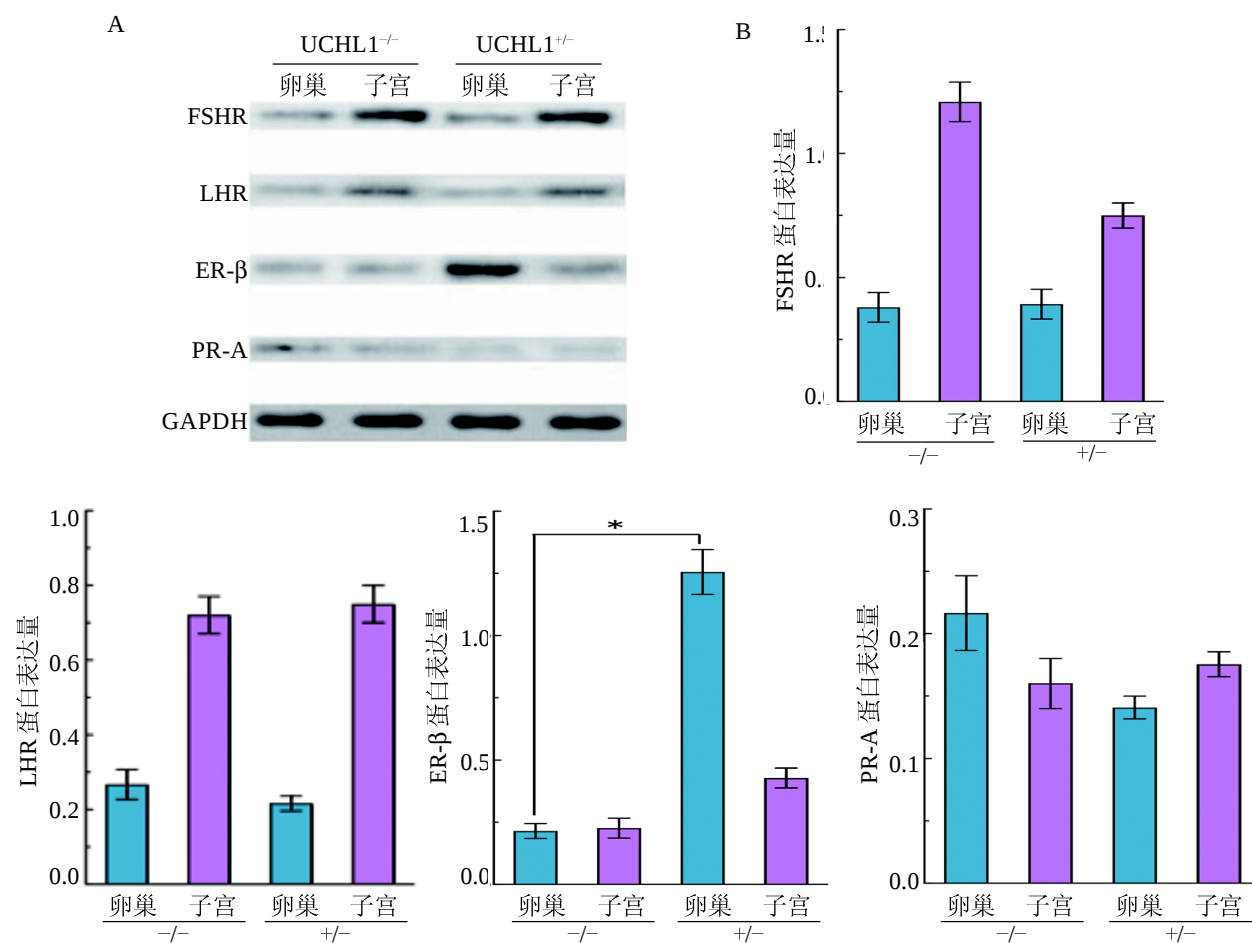
采用蛋白质印迹法检测成年 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢和子宫组织中 FSHR、LHR、ER-β 和 PR-A 表达水平,结果显示: UCH-L1^{-/-}小鼠卵巢中 ER-β 的表达水平明显低于 UCH-L1^{+/-}小鼠 ($P = 0.012 < 0.05$), 而 FSHR、LHR 和 PR-A 的表达水平没有明显差异; 在 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠子宫组织中, FSHR、LHR、ER-β 和 PR-A 的表达水平没有明显差异 (图 5A 和 B)。

通过免疫组织化学法检测成年 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢组织中 FSHR、LHR、ER-β 和 PR-A 的表达和分布, 结果如图 6 所示。FSHR 在

两种小鼠卵巢中都有表达, 定位于卵母细胞和颗粒细胞, 而且卵母细胞中表达较丰富; LHR 主要在颗粒细胞中表达, 两种小鼠都有微量表达; ER-β 也是在卵母细胞和颗粒细胞中都有表达, 卵母细胞中表达更丰富; PR-A 在两种小鼠的卵泡腔和卵母细胞膜上都有表达。

2.6 UCH-L1 基因缺失小鼠卵巢及卵泡形态观察

对成年 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢组织切片进行 HE 染色后观察发现, UCH-L1^{-/-}小鼠的卵巢纵切面明显小于 UCH-L1^{+/-}小鼠的卵巢纵切面, 表明 UCH-L1 缺失纯合型小鼠的卵巢体积明显小于杂合型小鼠。另外, UCH-L1^{-/-}小鼠卵巢皮质层存在一些原始卵泡或闭锁卵泡, 没有观察到有腔卵泡和黄体 (图 5A~F); 而 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢存在多个有腔成熟卵泡 (图 5G~H)。



FSHR 为卵泡刺激素受体, LHR 为黄体生成素受体, ER-β 为雌激素受体 β, PR-A 为孕激素受体 A。* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

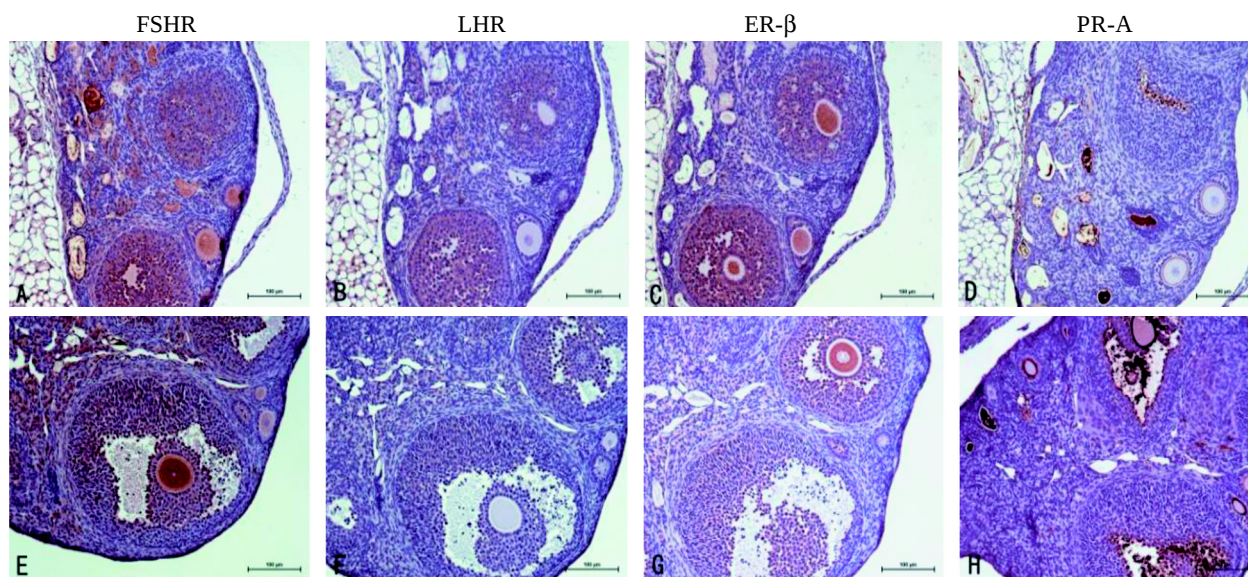
图 5 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢和子宫组织中关键受体蛋白的蛋白质印迹检测

Figure 5 Western blotting detection of key receptor proteins in ovarian tissues of UCH-L1^{-/-} and UCH-L1^{+/-} mice

2.7 UCH-L1 下调对卵母细胞成熟的影响

通过RNA干扰的方法下调C57BL/6雌性小鼠GV期卵母细胞中 UCH-L1 的表达后,探索 UCH-

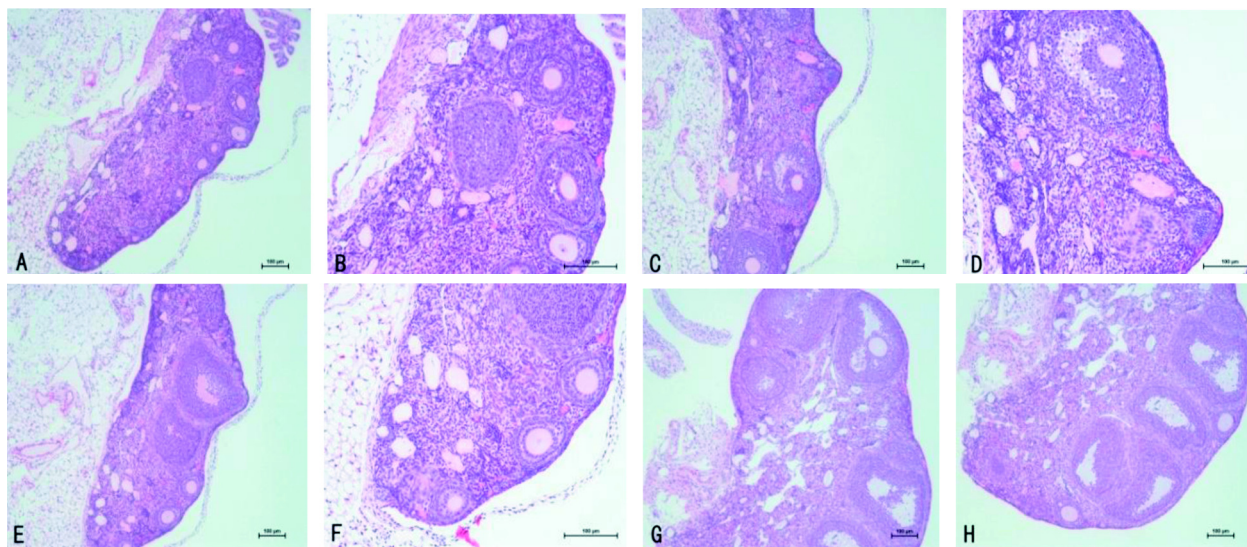
L1 对卵母细胞成熟的影响。结果表明, 下调 UCH-L1 表达能显著降低卵母细胞的成熟率 ($P = 0.023$, 图 8A 和 B)。



A~D 为 UCH-L1^{-/-}小鼠卵巢, E~H 为 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢。FSHR 为卵泡刺激素受体, LHR 为黄体生成素受体, ER-β 为雌激素受体 β, PR-A 为孕激素受体素受体 A。标尺大小均为 100 μm。

图 6 成年 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢组织中关键激素受体蛋白的免疫组织化学检测

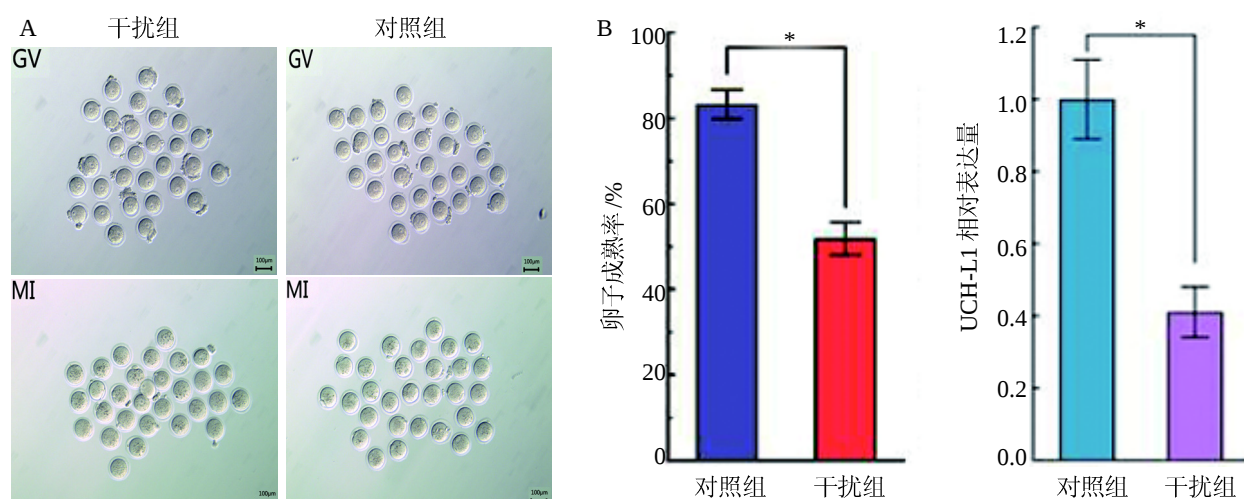
Figure 6 Immunohistochemical detection of key hormone receptor proteins in ovarian tissues of UCH-L1^{-/-} and UCH-L1^{+/-} mice



A~F 为 UCH-L1^{-/-}小鼠卵巢, G 和 H 为 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢。B、D 和 F 分别是 A、C 和 E 的局部放大, G 和 H 是同一切片的不同位置, 标尺大小均为 100 μm。

图 7 UCH-L1^{-/-}和 UCH-L1^{+/-}小鼠卵巢切片的苏木精 - 伊红染色

Figure 7 Hematoxylin-eosin staining of UCH-L1^{-/-} and UCH-L1^{+/-} mouse ovarian sections



A: 卵母细胞成熟情况观察(GV 指生发泡期, M I 指减数分裂 I 期, 标尺 = 100 μm)。B: 卵母细胞成熟率和 UCH-L1 表达下调分析。* $P < 0.05$, $n = 5$ 。

图 8 RNA 干扰 UCH-L1 表达对卵母细胞成熟率的影响

Figure 8 Effect of UCH-L1 knockdown by RNA interference on the rate of oocyte maturation

3 讨论

UCH-L1 是一种重要的去泛素化酶, 参与调节细胞的增殖、分化和凋亡, 以及神经退行性疾病的发生, 而且在精子生成、卵子发育和受精等过程中发挥作用^[11, 13]。UCH-L1 基因缺失小鼠被成功引进后, 严格按照 SPF 级标准进行饲养和繁殖。根据孟德尔遗传定律可知: 雌性杂合子和雄性杂合子进行交配繁殖, 其子代会出现 3 种基因型: 野生型 (UCH-L1^{+/+})、杂合型 (UCH-L1^{+/-}) 和纯合型 (UCH-L1^{-/-})^[14]。本研究中基因型鉴定结果符合预期, 即得到了 UCH-L1 基因完全缺失的纯合型雌性子代小鼠。文献显示 UCH-L1 缺失影响生殖功能^[15-17]。本研究中, 将纯合型小鼠作为 UCH-L1 缺失实验组, 而杂合型小鼠作为对照组; 初步鉴定显示, 该基因缺失 (靶向敲除了正常小鼠 UCH-L1 基因中第 6~8 个外显子及第 9 个外显子的前 6 个碱基) 杂合型小鼠的表型完全正常; 纯合型小鼠则表现出协调能力受损、体质偏低、毛发粗糙及脱毛现象严重, 且运动困难, 静止时不自主颤抖, 虽然其性腺外观正常, 但解剖发现子宫和卵巢都发育不良, 子宫偏细, 卵巢体积明显小于野生型小鼠卵巢体积。

本研究还发现, UCH-L1 缺失雌性小鼠不具备发情周期。利用阴道涂片法可以观察小鼠发情周期各阶段的阴道内部细胞组织形态学变化。由于阴道上皮细胞种类是随着小鼠排卵周期而变化的, 由此推断 UCH-L1 缺失雌性小鼠可能没有排卵活动, 间接说明其卵巢功能发育不完善。繁殖实验也进一步说明该小鼠不具备生育后代的能力。

免疫组织化学染色结果显示, 纯合型缺失小鼠的卵巢皮质层仅存在一些原始卵泡或闭锁卵泡, 没有腔卵泡和黄体, 说明没有成熟卵泡形成和排卵活动 (图 5)。同时, 通过 RNA 干扰的方法敲降 GV 卵母细胞中 UCH-L1 的表达后, 发现 UCH-L1 表达下调能显著降低卵母细胞的成熟率, 说明 UCH-L1 参与了卵母细胞的成熟过程。有研究证明, 在 GV 和 M II 期卵母细胞中能够检测到较多的 UCH-L1 mRNA, 与卵母细胞皮层相关; 而给 GV 期卵母细胞微量注射 UCH 家族酶抑制剂后, 发现卵母细胞的减数分裂被阻滞在 M I 期, 导致极体异常^[12]。因此, 当纯合型缺失小鼠卵巢中没有 UCH-L1 表达时, 卵泡的发生和发育受到影响, 卵巢中不能形成成熟卵母细胞, 取而代之的是出现大量原始卵泡和初级卵泡。

进一步的蛋白质印迹法和免疫组织化学染色结果显示, 在纯合型和杂合型小鼠的卵巢和子宫

中,与卵母细胞成熟和排卵相关的关键受体FSHR、LHR、ER- β 和PR-A的定位和表达没有明显差异。值得注意的是,UCH-L1^{+/+}杂合型小鼠卵巢中ER- β 表达量明显高于纯合型小鼠。

在生殖系统中主要存在两种雌激素受体:ER- α 和ER- β 。关于ER在卵巢及卵母细胞发育中的作用,目前研究主要集中在ER- β ^[18-19]。ER- β 主要存在于生长卵泡的颗粒细胞中^[18],也可在一些间质细胞中表达^[20]。ER- β 表达在卵泡发育的不同时期呈现阶段性特异性表达,在原始卵泡的颗粒细胞中表达量较少,在窦腔形成初期的卵泡中表达增加,在窦腔高度发展阶段的卵泡中表达量最多。已知雌激素主要来源于卵泡颗粒细胞,雌激素和FSH协同作用,刺激颗粒细胞有丝分裂和卵泡腔形成,从而促进卵母细胞成熟和优势卵泡排出^[21]。由此推测,UCH-L1基因缺失雌性小鼠卵巢中没有UCH-L1蛋白的表达,造成ER- β 表达量降低,进而发生排卵障碍。这与之前的发情周期观察和卵巢切片HE染色结果相互印证,都说明UCH-L1缺失雌性小鼠的生殖功能存在障碍。但是,UCH-L1缺失是怎样造成ER- β 降低的,还需要进一步研究探讨。

综上所述,UCH-L1缺失纯合型雌性小鼠不具备形成成熟卵泡及排卵的能力,卵巢中ER- β 表达量显著降低,推测UCH-L1有可能通过下调卵巢中ER- β 的表达,影响卵母细胞成熟及排卵过程。

参考文献:

- [1] Krabill AD, Chen H, Hussain S, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1: Biochemical and cellular characterization of a covalent cyanopyrrolidine-based inhibitor[J]. Chem Bio Chem, 2020, 21(5):712-722.
- [2] Bishop P, Rocca D, Henley JM. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): Structure, distribution and roles in brain function and dysfunction[J]. Biochem J, 2016, 473:2453-2462.
- [3] Kwan SY, Au-Yeung CL, Yeung TL, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) promotes uterine serous cancer cell proliferation and cell cycle progression[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(1):118.
- [4] Mtango NR, Sutovsky M, Vandervoort CA, et al. Essential role of ubiquitin C-terminal hydrolases UCHL1 and UCHL3 in mammalian oocyte maturation[J]. J Cell Physiol, 2012, 227:2022-2029.
- [5] Mtango NR, Sutovsky M, Susor A, et al. Essential role of maternal UCHL1 and UCHL3 in fertilization and preimplantation embryo development[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(4):1592-1603.
- [6] Shimada Y, Kudo Y, Maehara S, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 has prognostic relevance and is a therapeutic target for high-grade neuroendocrine lung cancers[J]. Cancer Sci, 2020, 111(2):610-620.
- [7] Kabuta T, Mitsui T, Takahashi M, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) acts as a novel potentiator of cyclin-dependent kinases to enhance cell proliferation independently of its hydrolase activity[J]. J Biol Chem, 2013, 288(18):12615-12626.
- [8] Mochida K, Matsubara T, Kudo H, et al. Molecular cloning and immunohistochemically localization of ubiquitin C-terminal hydrolase expressed in testis of a teleost, the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. J Exp Zool, 2002, 293(4):368-383.
- [9] Ellederova Z, Halada P, Man P, et al. Protein patterns of pig oocytes during *in vitro* maturation[J]. Biol Reprod, 2004, 71(5):1533-1539.
- [10] Bheda A, Gullapalli A, Caplow M, et al. Ubiquitin editing enzyme UCH L1 and microtubule dynamics: implication in mitosis[J]. Cell Cycle, 2010, 9(5):980-994.
- [11] Susor A, Ellederova Z, Jelinkova L, et al. Proteomic analysis of porcine oocytes during *in vitro* maturation reveals essential role for the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1[J]. Reproduction, 2007, 134(4):559-568.
- [12] Kuang Z, Yao Y, Shi Y, et al. Winter hibernation and UCHL1-p34cdc2 association in toad oocyte maturation competence[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e78785.
- [13] Wang Y, Wang L, Gao H, et al. UCHL1 expression and localization on testicular development and spermatogenesis of Chinese giant salamanders[J]. Oncotarget, 2017, 8(49):86043-86055.
- [14] 武磊, 赵博, 张志清, 等. UCH-L1基因敲除小鼠的饲养、繁殖及鉴定[J]. 解放军预防医学杂志, 2013, 31(5):388-391.
- [15] Sun ZG, Kong WH, Zhang YJ, et al. A novel ubiquitin carboxyl terminal hydrolase is involved in toad oocyte maturation[J]. Cell Res, 2002, 12(3/4):199-206.
- [16] 顾艳琼, 陈秋菊, 顾正, 等. 泛素羧基末端水解酶L1参与性成熟前小鼠卵母细胞的选择性剔除[J]. 生理学报, 2009, 61(2):175-184.
- [17] Susor A, Liskova L, Toralova T, et al. Role of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 in antipolyspermy defense of mammalian oocytes[J]. Biol Reprod, 2010, 82(6):1151-1161.

- [18] Ciucci A, Ferrandina G, Mascilini F, et al. Estrogen receptor beta: Potential target for therapy in adult granulosa cell tumors?[J]. *Gynecol Oncol*, 2018, 150(1):158-165.
- [19] Gregory CW, Wilson EM, Apparao KB, et al. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6):2960-2966.
- [20] Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Yen HW, et al. Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(12):5532-5538.
- [21] Satouh Y, Ikawa M. New insights into the molecular events of mammalian fertilization[J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(10):818-828.

Effect of Ubiquitin C-terminal Hydrolase 1 Gene Deletion on Reproductive System Development in Female Mice

WU Bi, LIANG Shanshan, RUAN Jingling, HUANG Xin, TENG Xiaoming, HONG Ling
(Department of Assisted Reproductive Medicine, Shanghai First Maternity and Infant Hospital,
Tongji University School of Medicine, Shanghai 200001, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (*UCH-L1*) gene deletion on the reproductive system of female mice. **Methods** Vaginal smears, immunohistochemistry, Western blotting and RNA interference methods were used to analyze the effects of *UCH-L1* gene deletion on the ovarian function and follicle development in mice. **Results** The adult female mice with *UCH-L1* deletion had lower body weight, dyskinesia and thinner uterus. No *UCH-L1* protein expression was detected in the ovaries and uteruses of *UCH-L1*-deleted homozygous mice, and the ovary volume was significantly smaller than that of heterozygous mice. There were some primitive or closed follicles in the ovarian cortex, and there was no mature follicle and corpus luteum. The key reproductive receptors including estrogen receptor (ER), follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and progesterone receptor (PR) were expressed in the ovary of *UCH-L1*-deleted homozygous and heterozygous mice. The expression level of ER in the ovary of *UCH-L1*-deleted homozygous mice was significantly lower than that of heterozygous mice. By RNA interference, knocking down the expression of *UCH-L1* in germinal vesicle (GV) oocytes could significantly reduce the maturation rate of oocytes. **Conclusion** The female mice with *UCH-L1* deletion do not have the ability to form mature follicles and ovulation. The expression of ER in the ovary of *UCH-L1* deletion mice is significantly reduced. It is speculated that *UCH-L1* may affect the oocyte maturation and ovulation by down-regulating ER expression in the ovaries.

[Key words] Ovary; Oocyte maturation; Ubiquitin C-terminal hydrolase 1; Mice